

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
11 novembre 2004 (11.11.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/095914 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : A01H 1/02,
5/12

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/050172

(22) Date de dépôt international : 23 avril 2004 (23.04.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0305126 25 avril 2003 (25.04.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : VIL-
MORIN [FR/FR]; Route du Manoir, La Garenne, F-49250
LA MENTRE (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) :
LECOMPTE, Alain [FR/FR]; 2 rue des FFI,
Appartement 221, 49100 ANGERS (FR).

(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc.; 7 rue de
Madrid, F-75008 PARIS (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasi-
en (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING RECOMBINANT PLANTS OF THE CICHORIUM GENUS AND PLANTS THUS OB-
TAINED

(54) Titre : PROCEDE D'OBTENTION DE PLANTES RECOMBINANTES DU GENRE CICHORIUM, ET PLANTES OBTE-
NUES PAR LE PROCEDE

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining recombinant plants of the Cichorium genus for forced cultivation and
comprising a phenotype determined by the expression of a combination of phenotypical characteristics derived from *Cichorium*
intybus L. and *Cichorium* *endivia* L., respectively.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte a un procédé d'obtention de plantes recombinantes du genre Cichorium aptes à la
culture par forçage, et possédant un phénotype déterminé par l'expression d'une combinaison de caractères phénotypiques dérivés de
Cichorium intybus L et de *Cichorium endivia* L, respectivement.

**PROCEDE D'OBTENTION DE PLANTES
RECOMBINANTES DU GENRE CICHORIUM, ET
PLANTES OBTENUES PAR LE PROCEDE**

5 La présente invention se rapporte à un procédé d'obtention de plantes recombinantes du genre *Cichorium* aptes à la culture par forçage, et possédant un phénotype déterminé par l'expression d'une combinaison de caractères phénotypiques dérivés de *Cichorium intybus* L et de *Cichorium endivia* L, respectivement.

10 Les plantes de l'espèce *Cichorium intybus* L aptes à la culture par forçage, aussi désignées endives, sont répandues dans toute l'Europe et les régions tempérées d'Asie. Il s'agit d'une plante très rameuse, à rameaux raides et écartés les uns des autres. Les feuilles inférieures sont ordinairement divisées, à lobes ou segments disposés des deux
15 côtés, écartées ou souvent renversées, avec un lobe terminal ; les feuilles situées plus haut sont entières, embrassant la tige par leur base, et les feuilles supérieures sont réduites à des bractées relativement très petites. Les cellules parenchymateuses des racines élaborent des
20 holosides (amidon, inuline, etc.) à partir de substances provenant des organes verts où elles ont été synthétisées. Au cours de la phase de croissance, les racines se renflent constamment par suite d'une hyperplasie de leurs parenchymes, à l'intérieur desquels s'accumulent des holosides, afin de former des racines tubérisées.

 L'aptitude de l'espèce *Cichorium i ntybus* L, et plus spécifiquement
25 de certaines variétés de cette espèce, telle que les variétés de type Witloof, à produire des racines tubérisées rend ces plantes aptes à être cultivées dans l'obscurité par « forçage ». La culture, pour un forçage de 21 jours, consiste à faire croître les endives dans des bacs contenant une solution nutritive amenée à une température d'environ 18°C à 21°C
30 avec simultanément une température de l'air de 1°C à 3°C inférieure à la température de la solution nutritive. Les endives sont cultivées par forçage dans l'obscurité afin de provoquer un étiolement des feuilles dans le but de produire des plantes matures essentiellement blanches dont seul le bord extérieur des feuilles possède une légère coloration
35 jaune.

Les producteurs d'endives sont à la recherche de nouveaux produits pour diversifier leur offre et leur permettre de présenter une gamme variée d'endives aux consommateurs finals.

5 La production d'endives par forçage est réalisée classiquement à grande échelle dans des salles où sont empilés des bacs dans lesquels sont placées les racines d'endives qui baignent dans une solution nutritive, dans des conditions d'obscurité, des conditions de température de la solution et de l'atmosphère, et des conditions d'hygrométrie contrôlées de manière précise. Ainsi, la culture de l'endive par forçage
10 nécessite des investissements financiers lourds en moyens matériels et humains afin de réaliser les différentes étapes respectives de semis, de récolte des racines et de leur forçage en salle de culture, afin de produire des endives à grande échelle.

15 La culture des endives par forçage est destinée à produire les chicons qui seront commercialisés. Les chicons sont essentiellement constitués de feuilles étiolées à l'obscurité, issues du collet de la racine. Les cycles de forçage suivent des conditions de culture, des cycles et des calendriers très précis et planifiés afin d'optimiser les coûts de production.

20 Pour pouvoir mettre à la disposition du public une gamme nouvelle et variée de plantes dérivées de l'endive, qui puisse être commercialisée à des coûts raisonnables, il est nécessaire que les plantes nouvelles soient adaptées aux conditions de production qui sont conventionnellement utilisées pour l'endive. En effet, de nouveaux
25 investissements industriels, qui devraient être spécifiquement adaptés à la production de nouvelles plantes du genre *Cichorium* ne seraient pas économiquement compatibles avec le marché. Toute nouvelle variété destinée à être produite par forçage doit en conséquence pouvoir s'intégrer dans le système de production déjà mis au point pour l'endive.

30 A la connaissance du demandeur, il n'a jamais été décrit dans l'état de la technique de procédé de recombinaison entre *Cichorium Intybus* L à racines tubérisées et *Cichorium endivia* L ayant abouti à la production de plantes utilisables commercialement et possédant une combinaison de caractères phénotypiques exprimés à partir des
35 caractères génétiques de chacune des lignées parentales initiales.

Des hybrides inter-spécifiques de génération F1 entre *Cichorium intybus* L et *Cichorium endivia* L ont déjà été décrits dans l'état de la technique. On peut citer en particulier l'hybridation réalisée en 1953 par Charles RICK (1953, Proceedings of the American Society for Horticultural Science, vol.61 : 459-466), qui a décrit des événements d'hybridation en champ entre ces deux espèces. RICK décrit aussi l'obtention de plantes de génération F2 produites par autofécondation des plantes de génération F1 en champ. RICK observe une très grande variabilité des caractères phénotypiques exprimés par les plantes de génération F2, notamment en ce qui concerne leur vigueur. Cet auteur en conclut que les nombreuses combinaisons de gènes provenant respectivement de la chicorée et de l'endive ne sont pas « harmonieuses » car elles réduisent de manière considérable le niveau de fertilité et de vigueur. Selon RICK, il existe une barrière génétique quasi-infranchissable entre la *Cichorium intybus* L. et *Cichorium endivia*, bien qu'un échange de gènes entre les deux espèces ait pu être exceptionnellement observé (voir page 464 de Rick, 1953). RICK observe aussi que les différences entre les deux génomes, respectivement de *Cichorium intybus* L et de *Cichorium endivia* L sont suffisantes pour provoquer des méioses imparfaites et des stérilités dans les descendance par autofécondation.

Les plantes hybrides de génération F1 du type « Castel Franco » ont longtemps été considérées comme le seul exemple d'échange de gènes entre ces deux espèces, par hybridation accidentelle, au 16^{ème} siècle en Italie (Annemieke M Kiers : Endive, Chicory and their wild relatives. Gorteria Supplément 5, Juillet 2000). Les études moléculaires récentes (Kiers, 2000), montrent que les deux espèces ne sont pas apparentées et que le type Castel Franco se rattache à *Cichorium intybus* L.

On a aussi décrit dans l'état de la technique un hybride de génération F1 entre *Cichorium intybus* L et *Cichorium endivia* L, qui a ensuite été propagé exclusivement *in vitro* par clonage, notamment aux fins d'études d'embryogenèse (Blervaq A.S. et al., 1995, Protoplasma, vol.186 :163-168). On a aussi montré que des plantes hybrides de génération F1 entre *Cichorium intybus* L et *Cichorium endivia* L

présentaient un caractère phénotypique de résistance au virus de la mosaïque du navet (TuMV), vraisemblablement du fait de la dominance de gènes de résistance au TuMV provenant de *Cichorium intybus* L (Providenti et al. , 1979, J. Amer. Soc. Hort. Sci., vol.104 (6): 726-728).

5 Il résulte de l'analyse qui précède qu'à la connaissance du demandeur, aucune chicorée à forcer issue de la recombinaison génétique entre *Cichorium intybus* L et *Cichorium endivia* L n'a été décrite à ce jour. Il existait même un préjugé technique de l'homme du
10 métier à l'encontre de l'obtention avec succès de plantes recombinantes entre ces deux espèces, et plus particulièrement des plantes recombinantes susceptibles de constituer des produits intermédiaires en vue de la sélection de variétés recombinantes à racines tubérisées, aptes à la culture par forçage et possédant des caractéristiques techniques de vigueur et de fertilité permettant leur exploitation
15 industrielle comme plantes légumières.

il n'a pas été décrit, jusqu'à aujourd'hui, un procédé d'obtention de plantes recombinantes du genre *Cichorium* issues d'un croisement initial entre ces deux espèces, et dont l'ordre et la nature des étapes du procédé auraient permis d'atteindre un tel objectif.

20 Un tel procédé d'obtention de plantes recombinantes entre *Cichorium intybus* L et *Cichorium endivia* L à racines tubérisées, et aptes à la culture par forçage, est désormais fourni selon l'invention.

Plus précisément, le demandeur s'est attaché à mettre au point un procédé d'obtention de telles plantes recombinantes du genre *Cichorium*,
25 qui comprend à la fois des étapes de croisement et de culture en champ ainsi que des étapes de culture et de clonage *in vitro*. En particulier, les étapes de culture et de clonage *in vitro*, essentielles pour la réalisation du procédé de l'invention, permettent de surmonter les nombreuses difficultés techniques rencontrées du fait d'une infection massive des
30 plantes recombinantes des premières générations par divers pathogènes bactériens et fongiques.

L'invention a donc pour objet un procédé d'obtention d'une plante recombinante du genre *Cichorium* possédant des racines tubérisées, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) réalisation d'un croisement entre une série de plantes femelles d'une variété de l'espèce *Cichorium intybus* L possédant des racines tubérisées et d'une série de plantes mâles d'une variété de l'espèce *Cichorium endivia* L et obtention d'une population de plantes hybrides de
5 génération F1 issues dudit croisement,

b) réalisation d'une autofécondation des plantes hybrides de génération F1 obtenues à l'étape a) et obtention de plantes recombinantes de génération F2 issues dudit croisement ;

c) sélection des plantes recombinantes de génération F2 dont les
10 bourgeons ou les racines ne possèdent pas d'altérations visibles dues à une infection virale, bactérienne ou fongique, notamment par *Erwinia carotovora*, par *Sclerotinia Sclerotiorum*, ou encore par *Phytophthora cryptogea* ;

d) Forçage des plantes recombinantes de génération F2
15 sélectionnées à l'étape c) pendant une durée de 10 à 18 jours dans les conditions suivantes de forçage :

- température de la solution nutritive : 15°C à 17°C ;

- température de l'atmosphère : 15°C à 17°C ;

e) clonage des plantes F2 obtenues à la fin de l'étape d) et
20 obtention de bourgeons régénérés ;

f) repiquage des bourgeons régénérés sur un milieu de culture approprié jusqu'à l'obtention de plantules recombinantes.

A l'étape a) du procédé, on réalise un croisement « manuel »
entre une série de plantes femelles d'une variété de l'espèce *Cichorium*
25 *intybus* L possédant des racines tubérisées et aptes au forçage et une série de plantes mâles d'une variété de l'espèce *Cichorium endivia* L.

Toute variété de l'espèce *Cichorium intybus* L peut être utilisée à l'étape a) du procédé.

Notamment, l'homme du métier peut avantageusement avoir
30 recours à la variété de *Cichorium intybus* L désignée « VIDENA », qui est apte au forçage hydroponique. La variété VIDENA est accessible au public auprès de la Collection Nationale du Groupe d'Etudes et de contrôle des Variétés Et des Semences (GEVES, Domaine de la Boisselière, 49250, Brion, France), sous la référence « Ref 500 » et le
35 numéro d'accès N° 925.

A l'étape a) du procédé, toute variété de *Cichorium endivia* L peut être utilisée . Toutefois, l'homme du métier aura avantageusement recours à la lignée « Grosse Pommant Seule », qui est accessible au public auprès de la Collection Nationale du GEVES (Brion, France) sous la référence « Ref 13746 » et le numéro d'accès N° 693.

A la fin de l'étape a), on obtient une série de plantes hybrides de génération F1 issue du croisement inter-spécifique décrit ci-dessus.

A l'étape b) du procédé, on réalise un croisement par auto-fécondation des plantes hybrides de génération F1 obtenue à l'étape a).

L'auto-fécondation est avantageusement réalisée de manière conventionnelle, dans une enceinte fermée et en présence d'insectes, par exemple des mouches, l'autofécondation étant alors effectuée par le transport, par lesdits insectes, des gamètes mâles prélevés sur les fleurs des plantes hybrides de génération F1 jusqu'aux organes reproducteurs femelles des plantes hybrides de génération F1 voisines, avec lesquels les gamètes mâles sont mis en contact. L'homme du métier peut avantageusement avoir recours à la technique classique d'autofécondation décrite par Hayes et al. (Methods of plant breeding, Mc Grow-Hill Book Company, 1955, Chapitre 5, pp 80-93) pour l'oignon, cette technique étant directement applicable à l'autofécondation de plantes du genre *Cichorium*.

On obtient des semences F2 issues de l'autofécondation des plantes hybrides de génération F1.

A la fin de l'étape b) du procédé, on obtient des plantes recombinantes de génération F2, à partir des semences F2 ci-dessus.

A la fin de l'étape b), le demandeur a observé que, très rapidement, de nombreuses plantes recombinantes de génération F2 étaient déficientes et sont mortes. De nombreuses autres plantes de génération F2 se sont révélées extrêmement sensibles à divers pathogènes bactériens ou fongiques, notamment vis-à-vis des bactéries *Erwinia carotovora* et les champignons *Sclerotinia sclerotiorum* et *Phytophthora cryptogea*.

En effet, l'arrachage des racines des plantes de génération F2 obtenues à la fin de l'étape b) du procédé a montré que les racines de *Cichorium endivia* L ainsi que le matériel issu du croisement

interspécifique était beaucoup plus sensible aux *Sclerotinia sclerotiorum* que les racines de *Cichorium intybus* L. Les racines de *Cichorium intybus* L étaient elles-mêmes contaminées par les plantes voisines malades.

5 En conséquence, l'étape c) du procédé a consisté en une sélection des plantes recombinantes de génération F2 obtenues à la fin de l'étape b) pour lesquelles les bourgeons ou les racines ne possédaient pas d'altération visible à l'œil due à une infection virale, bactérienne ou fongique, notamment par *Erwinia carotovora*, par *Sclerotinia sclerotiorum* ou encore par *Phytophthora cryptogea*.

10 A l'étape d), les racines des plantes recombinantes de génération F2 sélectionnées à l'étape c) ont été cultivées par forçage dans des conditions non conventionnelles qui ont été spécifiquement adaptées afin d'obtenir, à la fin de l'étape d) de forçage, des plantules recombinantes de génération F2 sensiblement exemptes d'une infection bactérienne ou
15 fongique .

Les conditions spécifiques de l'étape d) de forçage consistent en une combinaison de caractéristiques techniques de durée et de température.

20 Dans les conditions de températures prescrites, le demandeur a observé que l'étape d) de forçage pouvait être réalisée pendant une durée allant de 10 à 18 jours de forçage, une telle durée permettant à la fois l'obtention de plantules suffisamment développées pour être clonées à l'étape suivante e) tout en restant sensiblement exemptes d'altérations
25 visibles à l'œil provoquées par des infections par des pathogènes, surtout des bactéries ou des champignons. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la durée de l'étape d) de forçage est comprise entre 11 et 17 jours, des résultats encore plus avantageux étant obtenus avec une durée de forçage variant de 12 à 16 jours. Pour l'obtention de conditions
30 optimales de croissance des plantules recombinantes sans altération notable due à une infection bactérienne ou fongique, la durée de l'étape de forçage est de préférence comprise entre 13 et 15 jours et est de manière tout à fait préférée de 14 jours, au lieu d'un cycle classique de forçage de 21 jours.

35 L'étape de forçage d) est réalisée avec une solution nutritive de forçage conventionnelle qui est maintenue à une température allant de

15°C à 17°C, de préférence allant de 15,5°C à 16,5°C, la température optimale étant de 16°C, au lieu des températures allant de 18°C à 21°C appliquées pour une culture par forçage conventionnelle. Simultanément, la température de l'atmosphère, c'est-à-dire de l'air ambiant, est
5 identique à celle à laquelle est maintenue la solution nutritive, c'est-à-dire allant de 15°C à 17°C, avantageusement de 15,5°C à 16,5°C et est de manière tout à fait préférée de 16°C.

La durée courte et les températures particulièrement basses utilisées pour l'étape d) de forçage ont permis, de manière surprenante,
10 l'obtention de plantules ayant des caractéristiques de qualité sanitaire suffisantes pour que ces plantules soient subséquemment clonées *in vitro*.

Les autres conditions de l'étape d) de forçage, notamment la composition de la solution nutritive, sont conventionnelles. Elles sont
15 décrites notamment par Leteinturier et al. (L'endive-Guide Pratique. édition du CTIFL, Septembre 1991, pages 71.

De préférence, selon le procédé de l'invention, après sélection des plantes hybrides de génération F2 à l'étape c), l'étape d) de forçage est précédée d'une étape c1) au cours de laquelle les racines sélectionnées
20 à l'étape c) ont été traitées par trempage dans une solution désinfectante contenant une combinaison d'agents anti-bactériens et anti-fongiques. Avantageusement, l'homme du métier a recours à la procymidone (Sumisclex liquide, commercialisée par la société SOPRA), notamment à la concentration finale de 60 g/hL, pour inhiber la croissance de
25 *Sclerotinia*, et au mancozèbe (Dithane DG, commercialisé par la société ROHM & HAAS), notamment à la concentration de 400g/hl, pour inhiber la croissance de *Phytophthora*.

A la suite de l'étape d) de forçage ci-dessus, les chicons juvéniles ainsi obtenus sont avantageusement sélectionnés avant l'étape suivante
30 e) de clonage, sur des critères d'expression de caractères phénotypiques retrouvés dans la population très diverse et peu homogène de plantes recombinantes de génération F2.

Ainsi, la population de plantules de génération F2 obtenue à la fin de l'étape d) de forçage est très hétérogène. Cette population
35 recombinante F2 comprend des plantules de caractères phénotypiques

très variés, certaines plantules ayant des caractères phénotypiques tels qu'elles sont plutôt apparentées à la lignée parentale *Cichorium intybus* L., d'autres possédant des caractères phénotypiques tels qu'elles sont plutôt apparentées à la lignée parentale *Cichorium endivia* L.

5 Toutefois, l'ensemble des plantules recombinantes de génération F2 ayant subi l'étape d) de forçage après sélection ont toutes en commun de posséder des racines tubérisées, ce qui les rend aptes à une culture par forçage, ce qui est l'objectif poursuivi par l'invention. Le caractère recombinant de possession de racines tubérisées a été
10 apporté initialement par le génome du parent *Cichorium intybus* L. L'ensemble des plantules recombinantes retenues de génération F2 ont aussi toutes en commun de posséder des feuilles découpées. Le caractère recombinant de possession de feuilles découpées a été apporté initialement par le génome du parent *Cichorium endivia* L. Cette
15 combinaison de caractères phénotypiques que possèdent toutes les plantes recombinantes retenues de génération F2 qui ont été obtenues selon le procédé de l'invention permettent de définir, de manière générale, les plantes recombinantes obtenues à la fin de l'étape f) du procédé, aussi bien que les plantes recombinantes susceptibles d'être
20 obtenues à la suite d'étapes additionnelles du procédé, comme les étapes g) à j) qui sont décrites plus loin dans la présente description.

Les plantes de génération F2 obtenues dès la fin de l'étape b) du procédé selon l'invention consistent en des plantes recombinantes, c'est à dire en des plantes, lesquelles, après de multiples événements de
25 recombinaison entre l'ADN provenant de *Cichorium intybus* L. et l'ADN provenant de *Cichorium endivia* L., possèdent un génome recombiné de même ploïdie que la ploïdie de chacune des deux plantes parentes. Le génome recombiné des plantes de génération F2 selon l'invention exprime ainsi des combinaisons de caractères phénotypiques, certains
30 caractères phénotypiques étant retrouvés initialement chez *Cichorium intybus* L., et certains caractères phénotypiques étant retrouvés initialement chez *Cichorium endivia* L.

Ainsi, selon le procédé, l'étape de forçage d) est suivie d'une étape d1) au cours de laquelle les chicons juvéniles obtenus sont

sélectionnés avant l'étape e) de clonage, selon les trois classes de phénotypes suivants :

- (i) PPI : très nombreuses feuilles étroites sur un collet de racine en plateau ;
- 5 (ii) GPI : typologie proche de l'endive, mais avec une feuille étroite et découpée.
- (iii) TFR et SCA : feuilles ramifiées très dentées.

10 Les plantes recombinantes de génération F2 selon la classe de phénotype (iii) ci-dessus possèdent toutes des axes secondaires à l'axe principal de la feuille, comme cela est illustré dans le schéma général de la figure 1, ce qui est une caractéristique qui n'est jamais observée chez les *Cichorium intybus* L. Chez certains génotypes d'endive, telles que les endives de génotype « Barbe de Capucin », on peut observer que le

15 bord du limbe peut porter des découpures de faible profondeur, c'est à dire dont le rapport entre (i) la profondeur de la découpe et (ii) la longueur entre la pointe de la découpe et l'axe de la feuille ne dépasse pas 0,25 (voir figure 1), alors que ce rapport est considérablement plus élevé dans les plantes recombinantes de génération F2 selon l'invention.

20 De plus, chez ces génotypes d'endive telle que la Barbe de Capucin, les découpures ne sont présentes que dans le tiers supérieur de la feuille.

Les trois classes de plantes recombinantes de génération F2 obtenues de manière reproductible à l'issue de l'étape d) du procédé selon l'invention sont décrites plus en détails ci-dessous, en référence à

25 la mesure de plusieurs caractères phénotypiques qui permettent de les définir, qui sont représentées sur la figure 1, et qui sont respectivement les caractères suivants :

- Axe principal (1) et axes secondaires de la feuille (2) ;
- Largeur de la base de la feuille (3) ;
- 30 - Hauteur de la feuille (4) ;
- Profondeur de la découpe (5) et longueur entre la pointe de la découpe à l'axe de la feuille (6) ;
- Présence d'une dentelure secondaire (7).

35 **Description de la classe de plantes recombinantes PPI :**

- Pus de 100 feuilles par racine à l'issu du forçage (caractère recombinant provenant de *C endivia* L.), contre 20 à 35 au maximum chez une endive classique ;
- Pas d'axe secondaire ;
- 5 - Base de chaque feuille très étroite :
rapport largeur de la base de la feuille / hauteur de la feuille allant de 0,06 à 0,10 contre 0,25 au minimum pour une endive classique ;
- Découpures profondes du limbe :
rapport profondeur de la découpe / longueur de la pointe de la
10 découpe à l'axe de la feuille allant de 0,60 à 0,85, contre un rapport allant de 0 à 0,25 pour certains génotypes de *C intybus* L. ;
- Le bord des coupures comporte ou non des dentelures secondaires ;
- La coloration des nervures est blanche ou rouge ;
- 15 - La coloration du limbe est jaune ou rouge ;

Description de la classe de plantes recombinantes GPI :

- De 20 à 35 feuilles obtenues par racine à l'issu du forçage, comme pour une endive classique ;
- 20 - Pas d'axe secondaire ;
- Découpures profondes du limbe jusqu'à la base de la feuille :
rapport profondeur de la découpe / longueur de la pointe de la
découpe à l'axe de la feuille allant de 0,60 à 0,85, contre un
rapport allant de 0 à 0,25 pour certains génotypes de *C intybus* L. ;
- 25 - Le bord des coupures comporte ou non des dentelures secondaires ;
- La coloration des nervures est blanche ou rouge ;
- La coloration du limbe est jaune ou rouge ;

30 **Description de la classe de plantes recombinantes TFR et SCA:**

Description de la classe produit TFR :

- De 20 à 35 feuilles obtenues par racine à l'issu du forçage, comme une endive classique ;
- 2 à 5 axes secondaires à l'axe principal naissant dans la moitié
35 basale de la feuille ;

- Découpures profondes du limbe :
rapport profondeur de la découpure / longueur de la pointe de la découpure à l'axe de la feuille allant de 0,60 à 0,85 ;
- Le bord des coupures comporte ou non des dentelures secondaires ;
- La coloration des nervures est blanche ou rouge ;
- La coloration du limbe est jaune ou rouge ;

Description de classe produit SCA :

- 10 La définition est proche de celle des plantes recombinantes de la classe TFR .

Les coupures sont peu profondes et les dentelures quasi-inexistantes . Comme pour les TFR , la caractéristique majeure est la présence l'axes secondaires (caractéristiques uniquement trouvées chez certaines *C endivia* L. et jamais chez *C intybus* L.)

La population de plantes recombinantes F2, ainsi que les sous-populations de plantes recombinantes F2 sélectionnées selon les trois classes de phénotypes (i) à (iii) ci-dessus ne sont pas homogènes dans l'expression d'autres caractères phénotypiques que ceux qui ont été indiqués ci-dessus. Par exemple, les sous-populations de plantes recombinantes F2 (i) à (iii) comprennent elles-mêmes une grande diversité phénotypique entre elles, étant entendu qu'elles possèdent néanmoins en commun les caractères phénotypiques sur la base desquels elles ont été catégorisées dans la même classe.

De plus, le demandeur a pu observer que l'expression des caractères phénotypiques, autres que ceux sur la base desquels avaient été sélectionnées les différentes plantes F2, n'était pas stable au cours des générations successives, c'est-à-dire au cours des cycles successifs de reproduction, y compris par auto-fécondation des sous-populations (i) à (iii) définies ci-dessus.

A l'étape e) du procédé, la population de plantes recombinantes de génération F2, ou encore les sous-populations de classes de phénotypes (i) à (iii) définies ci-dessus, sont clonées en vue de l'obtention de bourgeons régénérés.

La sélection phénotypique et le clonage des plantes recombinantes F2 après forçage, et éventuellement sélection phénotypique, sont réalisés de manière conventionnelle, par exemple sur un milieu de culture adapté pour la régénération de bourgeons, tel que le milieu « ER » à partir de fragments de nervures de feuilles prélevées sur les chicons juvéniles obtenus à la fin de l'étape d) de forçage, éventuellement sur les plantes F2 préalablement sélectionnées dans les classes phénotypiques (i) à (iii), par exemple selon la technique décrite par Margara (Margara J, 1989, Bases de la multiplication végétative, INRA ed.). De préférence, les fragments de nervures de feuilles sont désinfectés à l'hypochlorite de calcium préalablement à leur culture en vue de la régénération de bourgeons sur le milieu de culture approprié.

L'étape de clonage des plantes recombinantes F2, éventuellement après leur sélection dans les classes phénotypiques (i) à (iii) ci-dessus, rend possible le contrôle prophylactique d'une éventuelle infection des plantules issues du forçage par des pathogènes bactériens ou fongiques. En effet, le demandeur a pu observer que les chicons juvéniles obtenus à la fin de l'étape d) du forçage étaient substantiellement sujets à une infection par *Sclerotinia sclerotinorum*, même lorsque l'étape de forçage était précédée d'un traitement des racines par une solution nutritive contenant une combinaison d'agents antibactériens ou antifongiques, comme cela est décrit ci-dessus.

L'étape e) de clonage, plus particulièrement lorsqu'elle comprend une désinfection des fragments de nervures de feuilles préalablement à la mise en culture sur le milieu de culture approprié en vue de la régénération des bourgeons, permet une amélioration considérable de l'état sanitaire du matériel végétal cloné.

L'étape e) de clonage est suivie d'une étape f) de repiquage des bourgeons ainsi régénérés sur un milieu de culture approprié, dans des conditions conventionnelles de repiquage de bourgeons, jusqu'à l'obtention de plantules hybrides de génération F2, clonées et repiquées. L'étape f) de repiquage est en soi classique et peut être réalisée par l'homme du métier selon toute technique connue en soi, par exemple sur le milieu spécifique « M4 » (Murashige T et Skoog F, 1962, Physiol.

Plant., Vol. 15 : 473-497) enrichi en AIA à la concentration finale de 0,2 mg/l.

Par exemple, l'homme du métier peut avantageusement avoir recours à la technique de repiquage décrite dans les exemples de la présente description.

Les plantules recombinantes F2 clonées et repiquées obtenues à la fin de l'étape f) peuvent ensuite être acclimatées, comme décrit dans les exemples, puis enracinées et placées en serre ou en champ.

Les plantes recombinantes F2 clonées et repiquées qui constituent le produit final de l'étape f) du procédé de l'invention, y compris les sous-populations de plantes recombinantes F2 clonées et repiquées préalablement sélectionnées selon leurs caractères phénotypiques dans les classes de phénotypes (i) à (iii), forment respectivement une population, ou trois sous-populations, très hétérogène(s) du point de vue de l'expression de leurs caractères phénotypiques. Par exemple, selon une illustration concrète de la mise en œuvre du procédé selon l'invention spécifiée dans les exemples, les plantes recombinantes F2 clonées et repiquées produits finals de l'étape f) du procédé se composent comme suit :

- dix plantes recombinantes F2 de la sous-classe (i) PPI ayant en commun de très nombreuses feuilles étroites sur un collet de racines en plateau mais qui diffèrent entre elles par de nombreux autres caractères phénotypiques ;

- huit plantes recombinantes F2 de sous-classe phénotypique (ii) GPI possédant en commun une typologie proche de l'endive avec une feuille étroite et découpée mais qui diffèrent entre elles par de nombreux autres caractères phénotypiques.

- quatre plantes recombinantes F2 appartenant à la sous-classe phénotypique (iii) SCA possédant en commun des feuilles ramifiées mais qui diffèrent entre elles par de nombreux autres caractères phénotypiques ;

- trois plantes recombinantes F2 de la sous-classe phénotypique (iii) TFR possédant en commun des feuilles ramifiées très dentées mais qui diffèrent entre elles par de nombreux autres caractères

phénotypiques ; et En outre, le demandeur a observé que, sur les 25 plantes recombinantes F2 obtenues à la fin de l'étape f) du procédé selon l'invention, seules 19 d'entre elles ont produit des semences après autofécondation, ce qui signifie que six plantes recombinantes F2 sur les dix neuf obtenues à la fin de l'étape f) du procédé sont fortement auto-incompatibles.

Le procédé d'obtention d'une plante hybride du genre *Cichorium* selon l'invention est caractérisé en ce qu'il peut comprendre en outre les étapes additionnelles suivantes :

g) culture en pleine terre des plantules recombinantes obtenues à la fin de l'étape f) ;

h) autofécondation des plantes recombinantes F2 obtenues à la fin de l'étape g) et obtention de plantes recombinantes de génération F3 par culture en pleine terre.

Les populations de plantes recombinantes F3 sont caractérisées du point de vue phénotypique leur aptitude commune à tubériser, c'est à dire à développer des racines adaptées à une culture par forçage.

Avantageusement, les plantes recombinantes de génération F3 obtenues à l'étape h) ci-dessus sont soumises à une étape (i) de forçage, si possible dans des conditions de forçage identiques à celles mises en œuvre pour l'étape d) du procédé, à savoir une durée de l'étape i) de forçage de dix à dix huit jours avec une température de la solution nutritive allant de 15°C à 17°C et une température de l'atmosphère allant de 15°C à 17°C, les températures de la solution nutritive et de l'atmosphère étant de préférence identiques.

Avantageusement, l'étape i) de forçage ci-dessus est suivie d'une étape j) de clonage des chicons juvéniles recombinants de génération F3, ladite étape de clonage pouvant être réalisée indifféremment à partir des fragments de nervures de feuilles ou à partir des bourgeons terminaux des plantules de génération F3 issus de la culture par forçage.

Selon une première alternative avantageuse, l'étape j) de clonage consiste en une étape de clonage des fragments de nervures de feuilles des plantules obtenues à la fin de l'étape (i) de forçage, qui est suivie d'une étape de régénération des plantules recombinantes de génération F4

Selon une seconde alternative avantageuse, l'étape j) de clonage consiste en une étape de clonage des bourgeons terminaux des plantules obtenues à la fin de l'étape (i) de forçage et régénération de plantules recombinantes de génération F4.

5 Comme pour les étapes d) et e) du procédé, les étapes i) et j) ci-dessus rendent possibles un contrôle de l'état sanitaire du matériel végétal : la combinaison de caractéristiques techniques de durée et de température de l'étape de forçage ainsi que la possibilité de « stériliser »
10 l'hypochlorite de calcium, par exemple à la concentration finale de 2,5% en poids, ont pour effet de limiter, voire de bloquer complètement, d'éventuelles infections dudit matériel végétal recombinant par des bactéries ou des champignons.

De préférence, selon le premier mode de réalisation de l'étape j)
15 de clonage ci-dessus, la génération de plantules recombinantes de génération F4 est réalisée en cultivant les fragments de nervures des feuilles de plantules sur un milieu spécifique « NF », comme décrit dans les exemples.

De préférence, selon le mode de réalisation de l'étape j) de
20 clonage ci-dessus, la régénération des plantules recombinantes de génération F4, à l'étape k) du procédé, est réalisée par culture des bourgeons terminaux sur un milieu spécifique M4, comme décrit dans les exemples.

Bien que conservant une grande diversité phénotypique, les
25 plantes recombinantes de génération F4 obtenues à la fin de l'étape j) ci-dessus présentent une excellente qualité sanitaire. Elles sont en particulier exemptes d'une infection par *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora* ou par *Erwinia carotovora*.

Les différentes sous-classes phénotypiques (i) à (iv) définies dans
30 la présente description sont retrouvées dans chacune des sous-classes phénotypiques des plantes recombinantes de génération F4.

On a montré selon l'invention que les plantes recombinantes de
génération F4 pouvaient être facilement cultivées par forçage dans des
conditions de forçage identiques à celles utilisées classiquement pour
35 *Cichorium intybus* L, de type Witloof. On a ainsi montré l'efficacité du

procédé selon l'invention pour l'obtention de plantes recombinantes du genre *Cichorium* possédant des racines tubérisées et aptes à la culture par forçage pour obtenir un matériel végétal produit final possédant des typologies végétales originales non connues jusqu'à présent, notamment
5 du matériel végétal produit final possédant les typologies végétales suivantes :

- chicons présentant des feuilles profondément découpées ne ressemblant ni aux endives, ni aux chicorées frisées ;
- des racines aussi tubérisées que celles de l'endive permettant
10 ainsi de respecter des protocoles de production et de forçage utilisés classiquement par les producteurs d'endives (*Cichorium intybus* L).

De plus, il est envisageable de fixer les caractères phénotypiques des plantes recombinantes de génération F4 obtenues selon le procédé de l'invention par plusieurs cycles successifs de reproduction de chacune
15 des plantes de génération F4 obtenues à l'issue du procédé, par autofécondation conventionnelle, ceci en vue d'obtenir des lignées de plantes recombinantes capables d'exprimer de manière stable une combinaison de caractères qui résultent d'un génotype ou d'une combinaison de génotypes, lesdits caractères étant exprimés de manière
20 homogène, afin de conférer à certaines plantes recombinantes dérivées des plantes recombinantes de génération Fn (avec n représentant un nombre entier au moins égal à 6 un caractère de variété végétale stable et homogène.

L'invention a également pour objet des plantes recombinantes
25 obtenues par le procédé défini ci-dessus dans la présente description, lesdites plantes recombinantes étant caractérisées en ce qu'elles sont issues d'un croisement initial entre une plante femelle d'une variété de l'espèce *Cichorium intybus* L possédant les racines tubérisées et d'une plante mâle d'une variété de l'espèce *Cichorium endivia* L et en ce
30 qu'elles présentent l'une des quatre classes de phénotypes suivantes :

- (i) PPI : très nombreuses feuilles étroites sur un collet de racine en plateau ;
- (ii) GPI : typologie proche de l'endive avec une feuille étroite et découpée, ou
35 (iii) TFR et SCA : feuilles ramifiées très dentées ;

Les plantes recombinantes selon l'invention englobent, notamment :

- 1) les plantes recombinantes de génération F2 obtenues à la fin de l'étape f) du procédé ;
- 5 2) Les plantes recombinantes de génération F3 obtenues à la fin de l'étape h) du procédé ;
- 3) les plantes recombinantes de génération F3 obtenues à la fin de l'étape i)
- 4) les plantes recombinantes de génération F4 obtenues à la fin
- 10 de l'étape f) du procédé.

La présente invention est en outre illustrée par les figures et les exemples suivants.

FIGURES

15 La **Figure 1** représente un schéma théorique d'une feuille étiolée d'une plante recombinante du genre *Cichorium* selon l'invention. Ce schéma théorique illustre les différents caractères phénotypiques permettant de définir une plante recombinante de l'invention, ou l'un de ses sous-types.

20 La **figure 2** est un cliché photographique d'une plante recombinante de génération F4 possédant de très nombreuses feuilles étroites sur un collet de racine en plateaux de la sous-classe phénotypique PPI.

25 La **figure 3** est un cliché photographique d'une plante recombinante de la génération F4 à feuilles ramifiées de la sous-classe phénotypique SCA.

La **figure 4** est un cliché photographique d'une plante recombinante de la génération F4 à feuilles ramifiées très dentées représentatives de la sous-classe phénotypique TFR.

30 La **figure 5** est un cliché photographique d'une plante recombinante de génération F4 d'une typologie proche de l'endive avec une feuille étroite et découpée représentative de la sous-classe phénotypique GPI.

35 La **figure 6** est un cliché photographique qui illustre la comparaison entre quatre plantes recombinantes du genre *Cichorium* du

type GPI de génération F4 selon l'invention (placées verticalement, en haut de la figure), avec une plante du genre *Cichorium intybus* L, aussi appelée endive (placée horizontalement, en bas de la figure).

5 La figure 7 est un cliché photographique qui montre le détail des découpures des feuilles d'une plante recombinante du genre *Cichorium* de type GPI de génération F4 selon l'invention.

La figure 8 est un cliché photographique qui illustre une plante recombinante du genre *Cichorium* de type GPI de génération F4 selon l'invention, apte à la culture par forçage.

10

EXEMPLES :

EXEMPLE 1 : Obtention de plantes de génération F2 selon les étapes a) à f) du procédé de l'invention.

15 **A. Matériels et Méthodes**

A.1. Milieux de culture

La composition qualitative et quantitative des milieux de culture « NF » et « M4 » utilisés dans les exemples sont indiquées dans les tableaux 1 et 2 ci-dessous, respectivement.

20

Tableau 1 : Milieu « NF »

NF (1 litre)	
Macroéléments MS (x10)	100 ml
Microéléments MS (x1000)	1 ml
Vitamines Gamborg (x1000)*	1 ml
NaFeEDTA (x100)	10 ml
Hydrolysate de caséine	1 g
Saccharose	40 g
Inositol	50 mg
BAP (dissoudre dans NaOH 1N)	0,2 mg
pH = 5,6	
Agar	10 g

*Vitamines Gamborg sans inositol

5

Tableau 2 : Milieu « M4 »

M4 (1 litre)	
Macroéléments MS (x10)	100 ml
Microéléments MS (x1000)	1 ml
Vitamines MS (x 1000)*	1 ml
NaFeEDTA (x 100)	10 ml
Saccharose	30 g
Inositol	100 mg
AIA (dissoudre dans alcool 95 °pur)	0.2 mg
pH = 5,8	
Agar	8 g

*Vitamines MS sans inositol

10 **A.2. Méthode de clonage in vitro des plantules recombinantes, à partir des nervures de feuilles de chicon.**

1) Prélèvement

- Choisir des feuilles internes du chicon ;
- Prélever la nervure des feuilles ;
- Placer les feuilles prélevées dans un pot de désinfection ;

5

1) Désinfection

L'étape de désinfection est réalisée avec une solution d'hypochlorite de calcium à la concentration finale de 2.5% + quelques gouttes de solution Tween® pendant 10 minutes. Puis on procède à trois étapes successives de rinçage avec de l'eau stérile, sous une hotte à flux laminaire.

10

2) Mise en culture - Régénération

- Placer les nervures sur un papier buvard stérile ;
- Découper des fragments de nervure d'une surface d'environ 1 cm² ;
- Mettre en culture sur milieu NF, dans un tube de verre approprié ;
- Placer les tubes en chambre de culture, dans les conditions de température et de luminosité suivantes :
 - Luminosité équivalente au jour pendant 16 heures, à la température de 25°C;
 - Conditions d'obscurité de la nuit pendant 16 heures, à la température de 20°C.

15

20

25

3) Enracinement

Après environ 3 semaines de culture sur milieu NF, lorsque les bourgeons régénérés se sont bien développés, on individualise les bourgeons et on repique chaque plantule dans des tubes sur du milieu M4, pour obtenir leur enracinement.

30

On place les tubes en chambre de culture, dans les conditions de température et de luminosité suivantes :

- Luminosité équivalente au jour pendant 16 heures, à la température de 25°C;

- Conditions d'obscurité de la nuit pendant 16 heures, à la température de 20°C.

4) **Acclimatation**

5 Dès que des racines apparaissent, on acclimate les plantules sur du terreau (en sac), dans des plaques alvéolées de 4 cm de diamètre et à 20°C à l'étouffée.

10 **B. Procédé d'obtention de plantes recombinantes du genre Cichorium de génération F2 selon l'invention**

a) Croisement manuel en serre de la lignée de Cichorium intybus « 1089 » par la lignée de Cichorium endivia « Grosse pommant seule », pour obtenir l'hybride F1.

15 Semis et élevage de 30 plantes F1 jusqu'au stade 3 feuilles, puis phase de 8 semaines de vernalisation à 5°C pour obtenir l'aptitude à la montée à graine.

b) Montée à graine et autofécondation (en serre chauffée) en présence de mouches pour obtenir les semences F2.

20 c) Semis au champ de 20000 semences F2.

Puis arrachage des racines en éliminant les plantes visiblement malades ou anormales (bourgeonnement adventif, éclatement de la racine...).

25 Traitement des 10 000 racines conservées (60g/hl de Procymidone et 400 g/hl de Mancozebe).

Stockage des racines en attente du forçage dans un réfrigérateur à 0°C .

d) Forçage court de 14 jours à 16°C.

30 A l'issue de ce forçage, la quasi totalité du système était contaminé.

D'où l'impossibilité de récupérer les plantes viables sur leurs racines.

e) Après observations sur les parties feuillées, nous avons retenu 25 plantes sur 4 typologies différentes :

35 PPI : 10 choix

SCA : 4 choix

TFR : 3 choix

GPI : 8 choix.

5 Pour régénérer ces choix nous avons procédé à la désinfection à l'hypochlorite de calcium de fragments de nervures étiolées (1 cm²) et mise en culture *in vitro* sur milieu NF. Mise en culture de 24 fragments par choix.

10 f) Trois semaines après, après avoir éliminé les fragments infectés, nous avons repiqué les bourgeons régénérés sur milieu M4 pour enracinement.

Cette étape s'est suivie d'une phase d'acclimatation à l'étouffée à 20°C.

15 **EXEMPLE 2 : Obtention de plantes de génération F3 selon l'invention, selon les étapes g) et h) du procédé.**

Les matériels et méthodes sont, sauf indication contraire, ceux qui ont été décrits à l'Exemple 1.

20 g) Après 8 semaines de vernalisation à 5°C, la croissance des plantes s'est faite en serre chauffée.

h) Les plantes ont fleuri pendant le mois d'avril individuellement sous un manchon de toile, pour y mettre les mouches et réaliser les autofécondations.

25 Au global, 19 choix ont donné des semences F3. Les autres plantes étaient incompatibles.

Traitement et acclimatation des plantes recombinantes de génération F3 obtenues à l'étape h).

30 Il a été procédé au semis de ces descendances F3 au champ.

1) A l'observation des plantes en croissance au champ, les typologies TFR se sont montrées très déficientes (dessèchement des feuilles...). Un choix SCA présentait des attaques de sclérotinia dès le stade au champ.

Il fallait de nouveau envisager un forçage bref, puisque les lots de racines se trouvaient porteurs d'inoculum.

Arrachage des racines.

5 Traitement des racines conservées (60g/hl de Procymidone et 400 g/hl de Mancozebe).

Stockage des racines en attente de forçage dans un frigo à 0°C.

2) En décembre nous avons dû une nouvelle fois forcer les racines en deux semaines à 16°C.

10 3) Très peu de plantes ont été gardées :

PPI : 1 choix

GPI : 2 choix

SCA : 3 choix.

15 Pour régénérer ces choix nous avons procédé à la désinfection à l'hypochlorite de calcium de fragments de nervures étiolées (1 cm²) et mise en culture *in vitro* sur milieu NF.

Mise en culture de 24 fragments par choix.

4) 3 semaines après avoir éliminé les fragments infectés, nous avons repiqué les bourgeons régénérés sur milieu M4 pour enracinement.

20 Cette étape s'est suivie par la phase d'acclimatation.

EXEMPLE 3 : Obtention de plantes de génération F4 de l'invention, selon les étapes i) et j) du procédé.

25 Les matériels et méthodes sont, sauf indication contraire, ceux qui ont été décrits à l'Exemple 1.

a) Après 8 semaines de vernalisation à 5°C, la croissance des plantes s'est faite en serre chauffée.

30 Les plantes ont fleuri pendant le mois d'Avril 1997 individuellement sous un manchon de toile, pour y mettre les mouches et réaliser les autofécondations.

b) Puis semis au champ des générations F4.

A ce stade F4, les plantes obtenues n'ont pas présenté de déficiences au champ et le forçage des racines récoltées a pu s'envisager dans un schéma classique de production de l'indice (3

semaines à 19°C). La phase délicate des générations F2 et F3 étant passée.

- c) Pendant le forçage, les descendances retenues ont montré une bonne aptitude au forçage et des caractéristiques phénotypiques qui sont
- 5 le point de départ d'une diversification des chicorées forçables.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention d'une plante recombinante du genre *Cichorium* possédant des racines tubérisées, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) réalisation d'un croisement entre une série de plantes femelles d'une variété de l'espèce *Cichorium intybus* L possédant des racines tubérisées et d'une série de plantes mâles d'une variété de l'espèce *Cichorium endivia* L et obtention d'une population de plantes hybrides de génération F1 issues dudit croisement,

b) réalisation d'une autofécondation des plantes hybrides de génération F1 obtenues à l'étape a) et obtention de plantes recombinantes de génération F2 issues dudit croisement ;

c) sélection des plantes recombinantes de génération F2 dont les bourgeons ou les racines ne possèdent pas d'altérations visibles dues à une infection virale, bactérienne ou fongique, notamment par *Erwinia carotovora*, par *Sclerotinia sclerotiorum*, ou encore par *Phytophthora cryptogea* ;

d) Forçage des plantes recombinantes de génération F2 sélectionnées à l'étape c) pendant une durée de 10 à 18 jours dans les conditions suivantes de forçage :

- température de la solution nutritive : 15°C à 17°C ;

- température de l'atmosphère : 15°C à 17°C ;

e) clonage des plantes F2 obtenues à la fin de l'étape d) et obtention de bourgeons régénérés ;

f) repiquage des bourgeons régénérés sur un milieu de culture approprié jusqu'à l'obtention de plantules recombinantes.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape d) de forçage est suivie d'une étape d1) au cours de laquelle les chicons juvéniles obtenus sont sélectionnés, avant l'étape e) de clonage, selon les trois classes de phénotype suivants :

(i) PPI : très nombreuses feuilles étroites sur un collet de racine en plateau ;

(ii) GPI : typologie proche de l'endive avec une feuille étroite et découpée ; et

(iii) TFR et SCA : feuilles ramifiées très dentées.

5 3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes additionnelles suivantes :

g) culture en pleine terre des plantules recombinantes obtenues à la fin de l'étape f) ;

10 h) autofécondation des plantes recombinantes F2 obtenues à l'étape g) et obtention de plantes recombinantes de génération F3 par culture en pleine terre.

15 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les plantes recombinantes de génération F3 obtenues à l'étape h) sont soumises à une étape i) de forçage pendant une durée de 10 à 18 jours, dans les conditions de forçage suivantes :

- température de la solution nutritive : 15°C à 17°C ;

- température de l'atmosphère : 15°C à 17°C.

20 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape j) de clonage des chicons juvéniles recombinants obtenus à la fin de l'étape i) de forçage.

25 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'étape j) de clonage consiste en un clonage des fragments de nervure des feuilles des plantules obtenues à la fin de l'étape i) de forçage et régénération de plantules recombinantes de génération F4.

30 7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'étape j) de clonage consiste en un clonage des bourgeons terminaux des plantules obtenues à la fin de l'étape i) de forçage et régénération de plantules recombinantes de génération F4.

8. Plantes recombinantes obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles possèdent (i) des racines tubérisées et (ii) des feuilles découpées.

- 5 9. Plantes recombinantes selon la revendication 8, caractérisées en ce qu'elles sont de la classe PPI et présentent les caractéristiques phénotypiques communes suivantes :
- Pus de 100 feuilles par racine à l'issu du forçage ;
 - Pas d'axe secondaire ;
 - 10 - Base de chaque feuille très étroite :
rapport largeur de la base de la feuille / hauteur de la feuille allant de 0,06 à 0,10;
 - Découpures profondes du limbe :
rapport profondeur de la découpure / longueur de la pointe de la
15 découpure à l'axe de la feuille allant de 0,60 à 0,85 ;
 - Le bord des découpures comporte ou non des dentelures secondaires ;
 - La coloration des nervures est blanche ou rouge ;
 - La coloration du limbe est jaune ou rouge ;
- 20
10. Plantes recombinantes selon la revendication 8, caractérisées en ce qu'elles sont de la classe GPI et présentent les caractéristiques phénotypiques communes suivantes :
- De 20 à 35 feuilles obtenues par racine à l'issu du forçage ;
 - 25 - Pas d'axe secondaire ;
 - Découpures profondes du limbe jusqu'à la base de la feuille :
rapport profondeur de la découpure / longueur de la pointe de la
découpure à l'axe de la feuille allant de 0,60 à 0,85 ;
 - Le bord des découpures comporte ou non des dentelures
30 secondaires ;
 - La coloration des nervures est blanche ou rouge ;
 - La coloration du limbe est jaune ou rouge ;

11. Plantes recombinantes selon la revendication 8, caractérisées en ce qu'elles sont de la classe TFR ou SCA et présentent les caractéristiques phénotypiques communes suivantes :

- De 20 à 35 feuilles obtenues par racine à l'issu du forçage ;
- 5 - 2 à 5 axes secondaires à l'axe principal naissant dans la moitié basale de la feuille ;
- Découpures profondes du limbe :
rapport profondeur de la découpure / longueur de la pointe de la découpure à l'axe de la feuille allant de 0,60 à 0,85 ;
- 10 - Le bord des découpures comporte ou non des dentelures secondaires ;
- La coloration des nervures est blanche ou rouge ;
- La coloration du limbe est jaune ou rouge ;

1/8

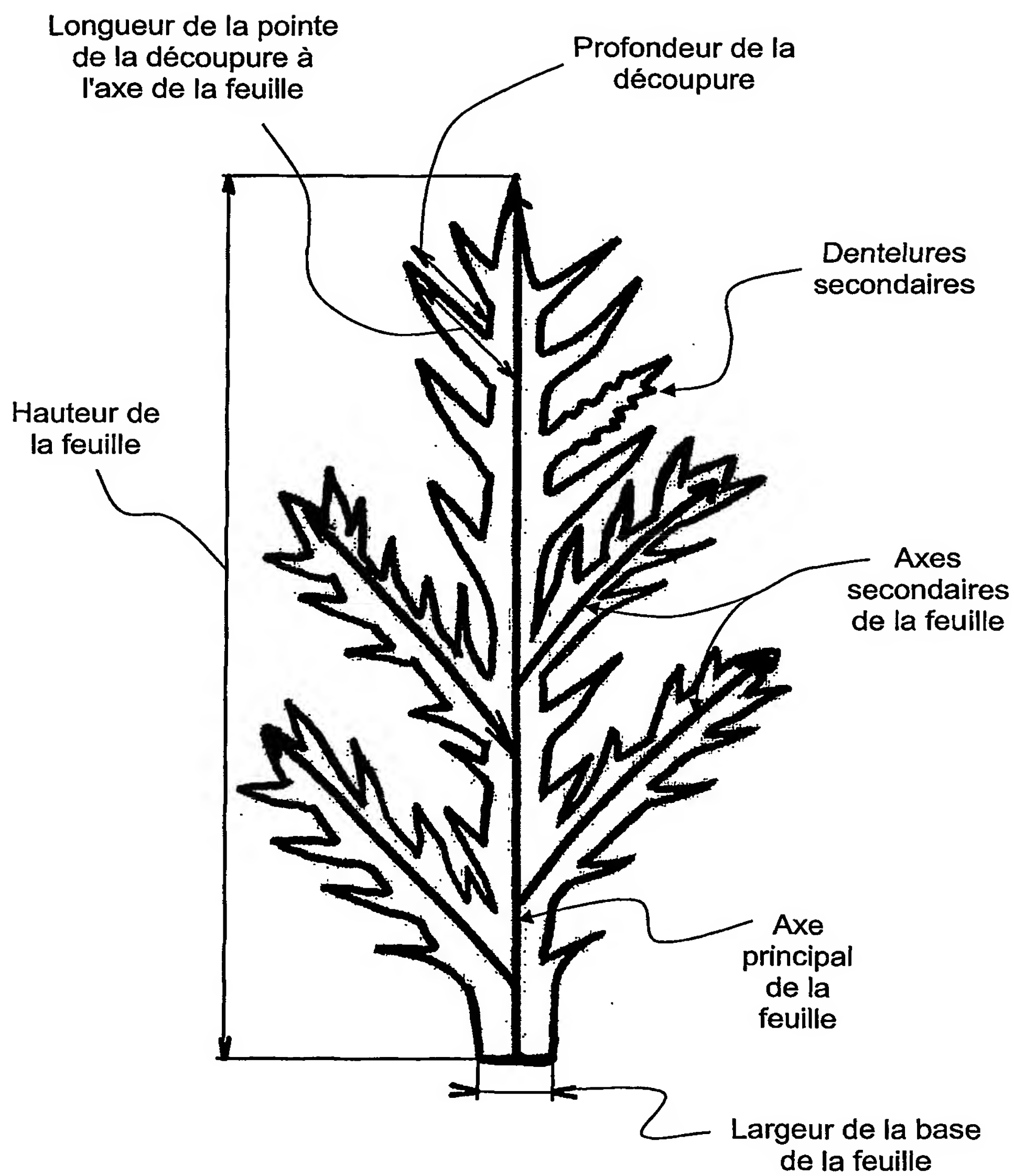


FIGURE 1

2/8

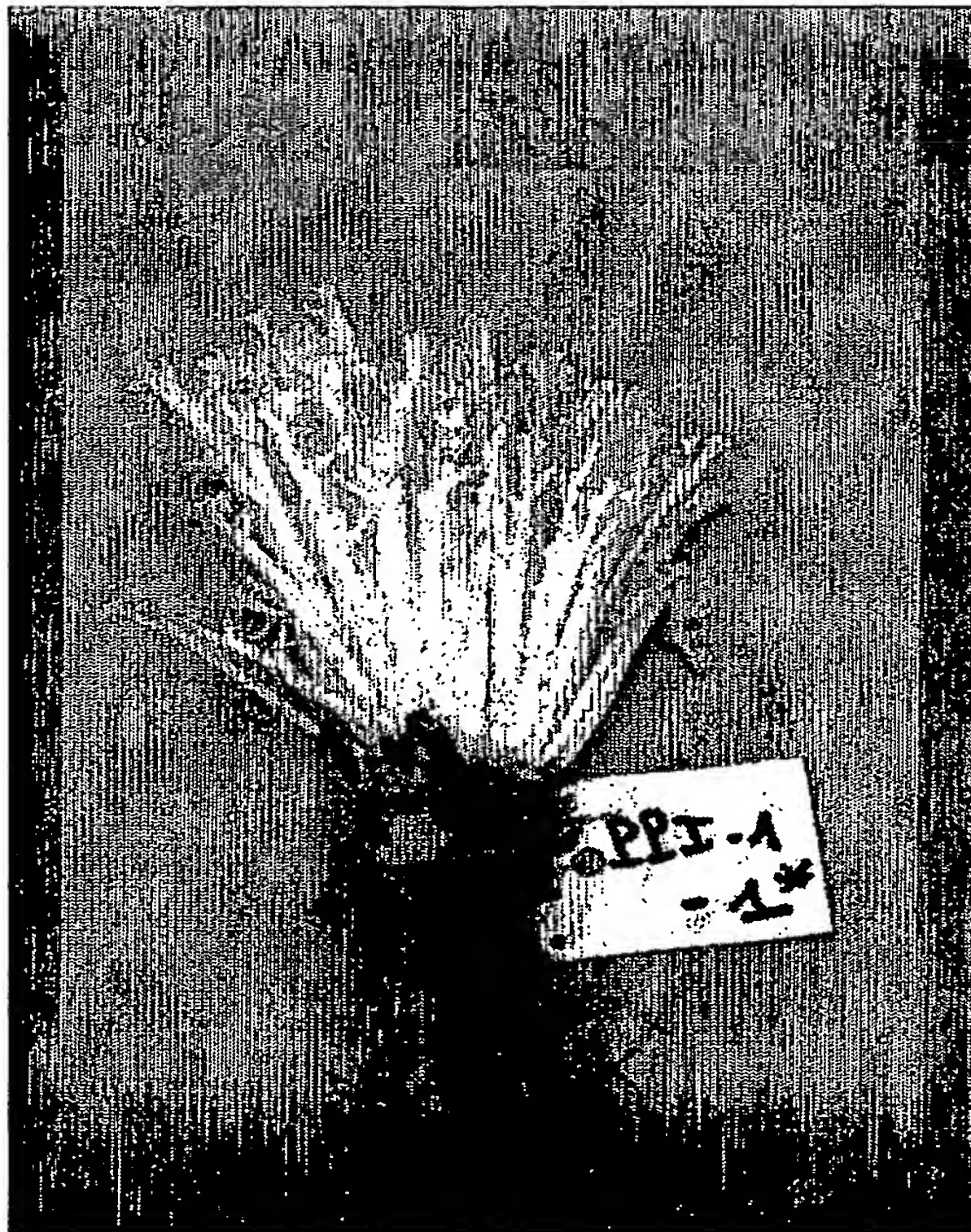


FIGURE 2

3/8

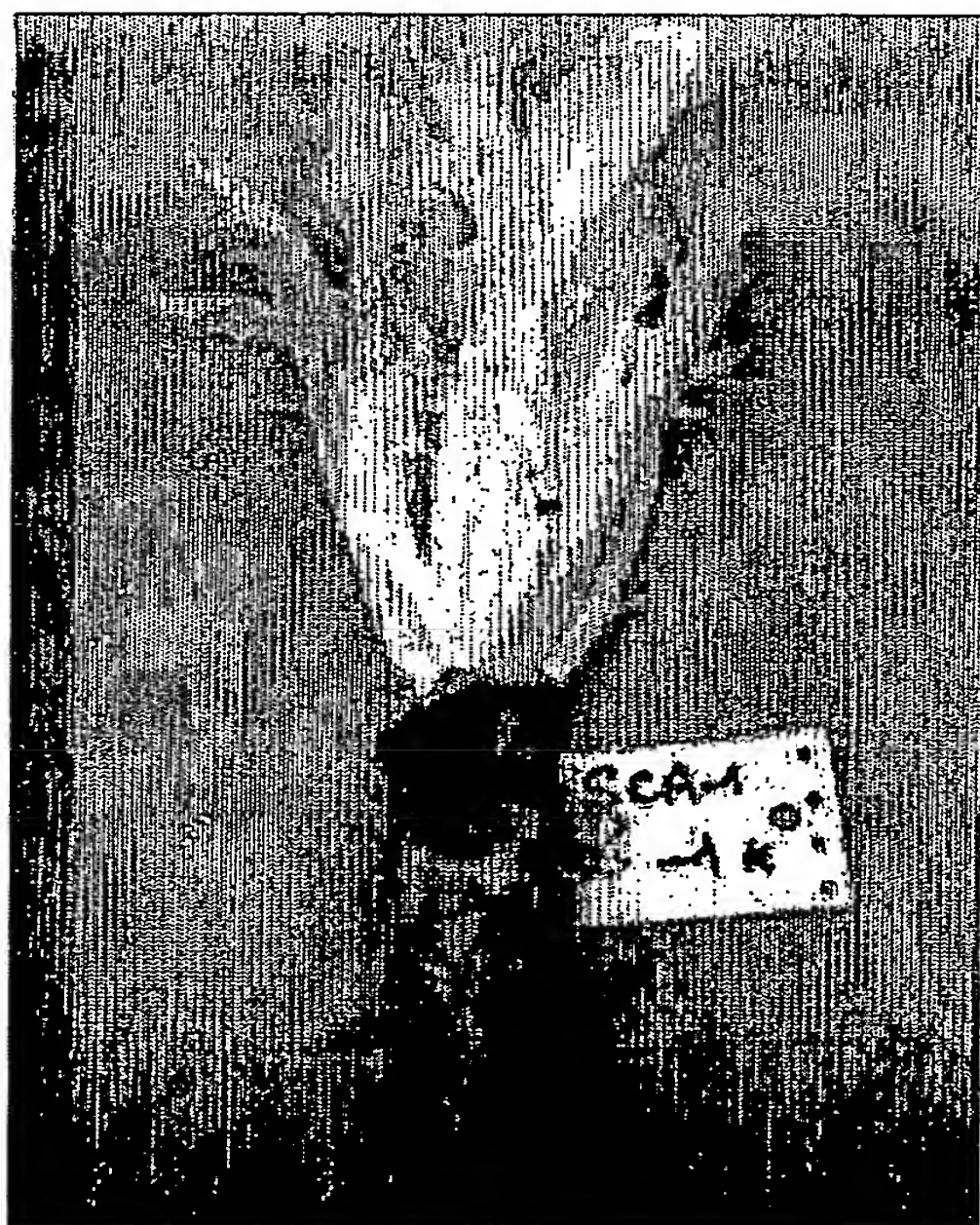


FIGURE 3

4/8



FIGURE 4

5/8

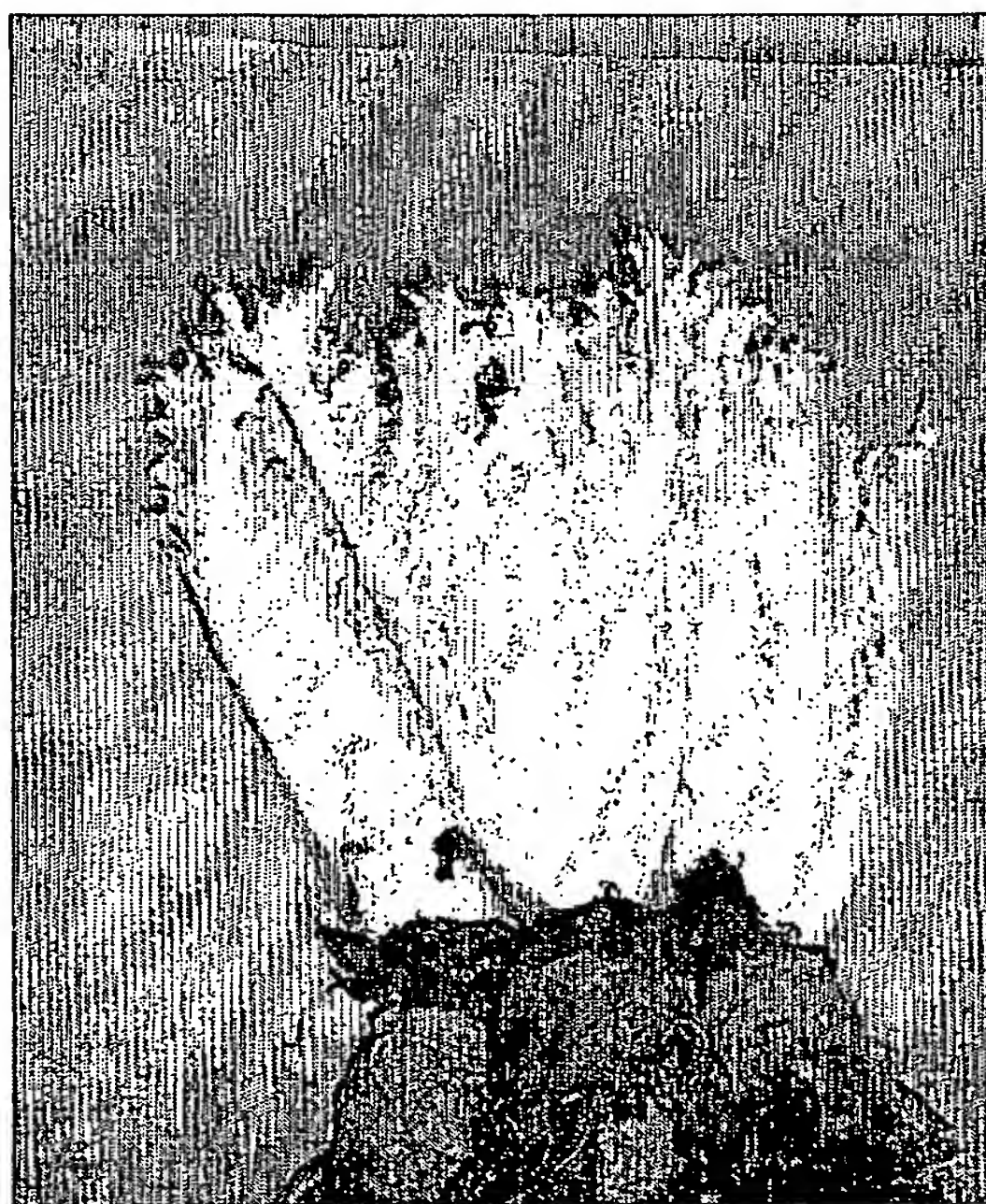


FIGURE 5

6/8



FIGURE 6

7/8



FIGURE 7

8/8

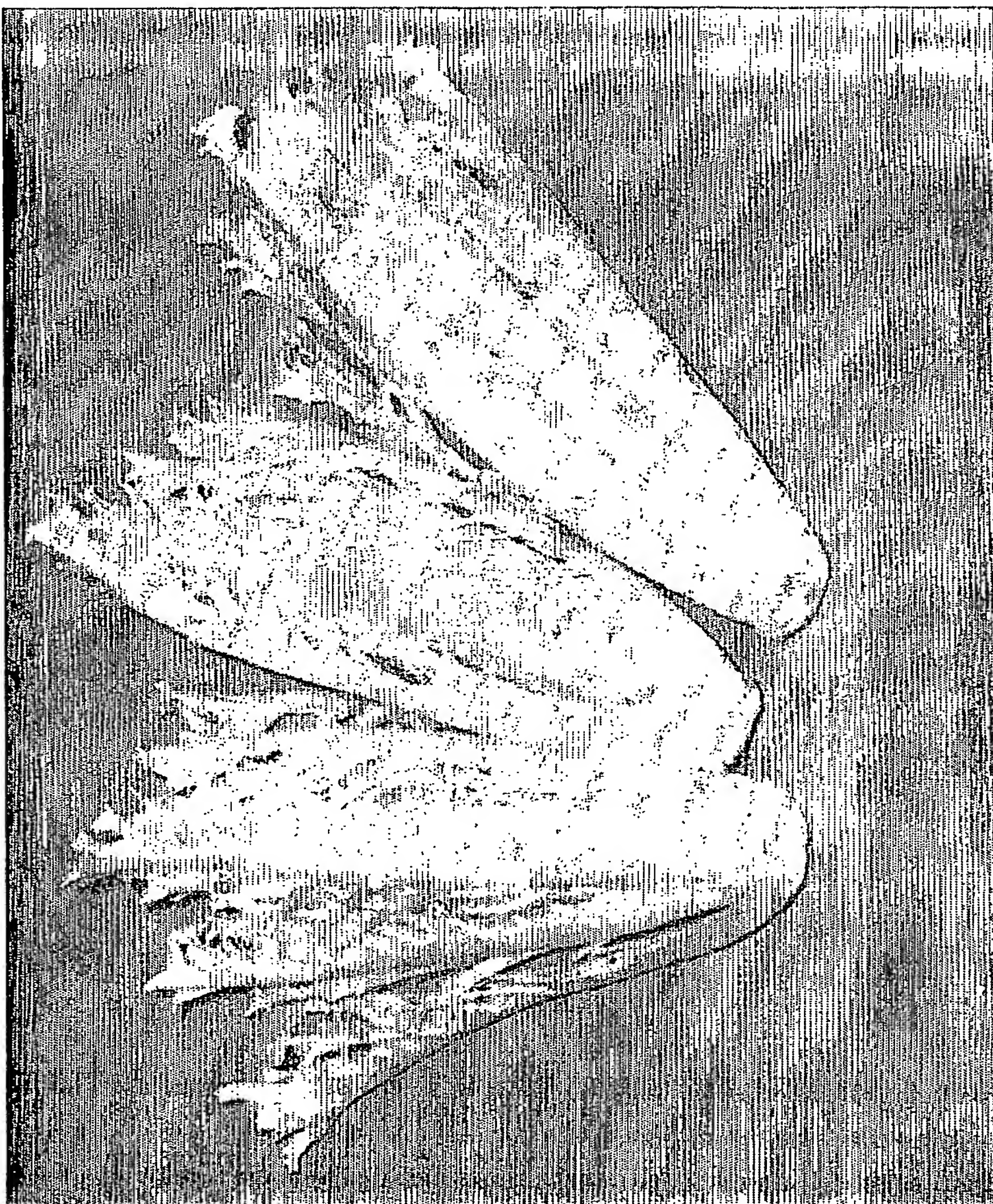


FIGURE 8

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
11 novembre 2004 (11.11.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/095914 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ : A01H 1/02,
5/12

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/050172

(22) Date de dépôt international : 23 avril 2004 (23.04.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0305126 25 avril 2003 (25.04.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : VIL-
MORIN [FR/FR]; Route du Manoir, La Garenne, F-49250
LA MENTRE (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) :
LECOMPTE, Alain [FR/FR]; 2 rue des FFI,
Appartement 221, 49100 ANGERS (FR).

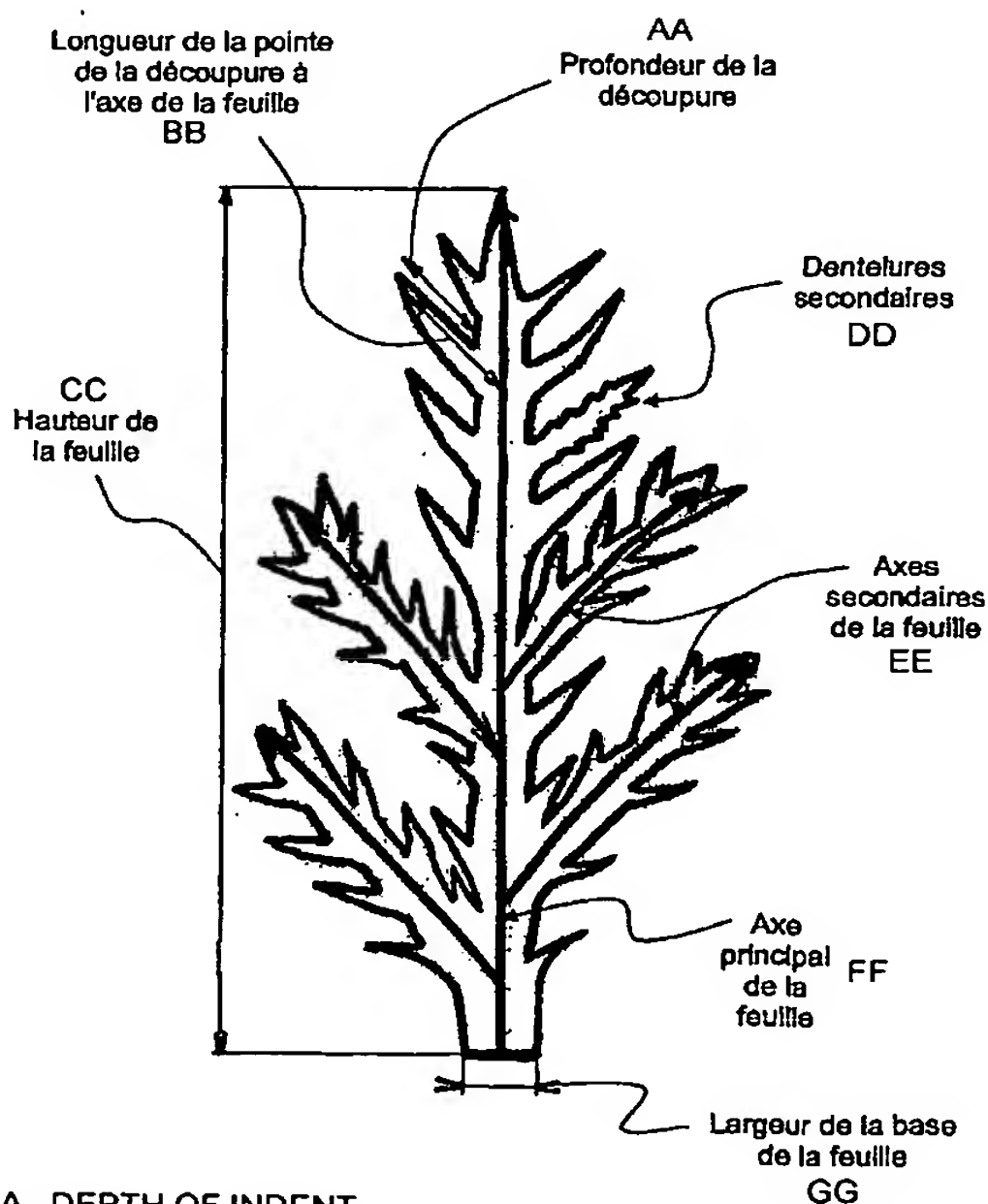
(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc.; 7 rue de
Madrid, F-75008 PARIS (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING RECOMBINANT PLANTS OF THE CICHORIUM GENUS AND PLANTS THUS OB-
TAINED

(54) Titre : PROCEDE D'OBTENTION DE PLANTES RECOMBINANTES DU GENRE CICHORIUM, ET PLANTES OBTENUES PAR LE PROCEDE



AA...DEPTH OF INDENT
BB...LENGTH FROM THE POINT OF THE INDENT TO THE LEAF AXIS
CC...LEAF HEIGHT
DD...SECONDARY DENTATIONS
EE...SECONDARY AXES OF THE LEAF
FF...PRINCIPAL LEAF AXIS
GG...WIDTH OF THE LEAF BASE

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining recombinant plants of the Cichorium genus for forced cultivation and comprising a phenotype determined by the expression of a combination of phenotypical characteristics derived from *Cichorium intybus* L and *Cichorium endivia* L, respectively.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte a un procédé d'obtention de plantes recombinautes du genre Cichorium aptes à la culture par forçage, et possédant un phénotype déterminé par l'expression d'une combinaison de caractères phénotypiques dérivés de *Cichorium intybus* L et de *Cichorium endivia* L, respectivement.

WO 2004/095914 A3



PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

27 octobre 2005

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/050172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A01H1/02 A01H5/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIDIKOU-SEYNI R ET AL: "SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM PROTOPLASTS OF CICHORIUM-INTYBUS L. X CICHORIUM-ENDIVIA L" PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE, vol. 29, no. 2, 1992, pages 83-91, XP008026474 ISSN: 0167-6857 the whole document	1-11
X	BLERVACQ A S ET AL: "First divisions of somatic embryogenic cells in Cichorium hybrid "474"" PROTOPLASMA, vol. 186, no. 3-4, 1995, pages 163-168, XP008026478 ISSN: 0033-183X the whole document	1-11



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 2004

Date of mailing of the international search report

22/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/050172

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PAPETTI ADELE ET AL: "Anti- and pro-oxidant water soluble activity of Cichorium genus vegetables and effect of thermal treatment" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 50, no. 16, 31 July 2002 (2002-07-31), pages 4696-4704, XP001176884 ISSN: 0021-8561 page 4697, left-hand column, paragraph 1; table 1</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>HELLEBOID STEPHANE ET AL: "Three major somatic embryogenesis related proteins in Cichorium identified as PR proteins" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 51, no. 348, July 2000 (2000-07), pages 1189-1200, XP002267221 ISSN: 0022-0957 the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>HELLEBOID STEPHANE ET AL: "Inhibition of direct somatic embryogenesis by alpha-difluoromethylarginine in a Cichorium hybrid: Effects on polyamine content and protein patterns" PLANTA (HEIDELBERG), vol. 196, no. 3, 1995, pages 571-576, XP008026516 ISSN: 0032-0935 page 571, right-hand column, paragraph 2</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De  de Internationale No
PCT/FR2004/050172

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A01H1/02 A01H5/12

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SIDIKOU-SEYNI R ET AL: "SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM PROTOPLASTS OF CICHORIUM-INTYBUS L. X CICHORIUM-ENDIVIA L" PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE, vol. 29, no. 2, 1992, pages 83-91, XP008026474 ISSN: 0167-6857 le document en entier	1-11
X	BLERVACQ A S ET AL: "First divisions of somatic embryogenic cells in Cichorium hybrid "474"" PROTOPLASMA, vol. 186, no. 3-4, 1995, pages 163-168, XP008026478 ISSN: 0033-183X le document en entier	1-11

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *G* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 octobre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/10/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Holtorf, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De...de Internationale No

PCT/FR2004/050172

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>PAPETTI ADELE ET AL: "Anti- and pro-oxidant water soluble activity of Cichorium genus vegetables and effect of thermal treatment"</p> <p>JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 50, no. 16, 31 juillet 2002 (2002-07-31), pages 4696-4704, XP001176884 ISSN: 0021-8561 page 4697, colonne de gauche, alinéa 1; tableau 1</p>	1-11
A	<p>-----</p> <p>HELLEBOID STEPHANE ET AL: "Three major somatic embryogenesis related proteins in Cichorium identified as PR proteins"</p> <p>JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 51, no. 348, juillet 2000 (2000-07), pages 1189-1200, XP002267221 ISSN: 0022-0957 le document en entier</p>	
A	<p>-----</p> <p>HELLEBOID STEPHANE ET AL: "Inhibition of direct somatic embryogenesis by alpha-difluoromethylarginine in a Cichorium hybrid: Effects on polyamine content and protein patterns"</p> <p>PLANTA (HEIDELBERG), vol. 196, no. 3, 1995, pages 571-576, XP008026516 ISSN: 0032-0935 page 571, colonne de droite, alinéa 2</p> <p>-----</p>	